

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1925

N°

104

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1925

PAR

José-Januario CARNEIRO FILHO

Né le 18 juillet 1899, à Ouro-Preto (Minas Geraes), Brésil

Médecin vétérinaire en mission d'études en France

Certificat de bactériologie de la Faculté de Médecine de Lyon

Certificat de médecine vétérinaire exotique de l'Ecole d'Alfort

Assistant au laboratoire de M. le Professeur Vallée

(Laboratoire de Recherches du Ministère de l'Agriculture)

ESSAIS

SUR LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

DU CHARBON BACTÉRIDIIEN

(Recherche de la bactérie dans la moelle osseuse. Valeur de la réaction d'Ascoli)

JURY { *Président* : M. BRUMPT, professeur à la Faculté de Médecine
 { *Assesseurs* : { M. PANISSET { professeurs à l'École Nationale
 { M. VALLÉE { Vétérinaire d'Alfort

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

45, RUE RACINE, 45

1925

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1925

N°

104

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1925

PAR

José-Januario CARNEIRO FILHO

Né le 18 juillet 1899, à Ouro-Preto (Minas Geraes), Brésil

Médecin vétérinaire en mission d'études en France

Certificat de bactériologie de la Faculté de Médecine de Lyon

Certificat de médecine vétérinaire exotique de l'Ecole d'Alfort

Assistant au laboratoire de M. le Professeur Vallée

(Laboratoire de Recherches du Ministère de l'Agriculture)

ESSAIS

SUR LE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

DU CHARBON BACTÉRIDIIEN

(Recherche de la bactérie dans la moelle osseuse. Valeur de la réaction d'Ascoli)

JURY { *Président* : M. BRUMPT, professeur à la Faculté de Médecine
 { *Assesseurs* : { M. PANISSET { professeurs à l'École Nationale
 { M. VALLÉE { Vétérinaire d'Alfort

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

13, RUE CACINE, 13

1925

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Directeurs honoraires : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLÉE.

Directeur : M. E. NICOLAS.

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général honoraire des Écoles Vétérinaires, P.-J. CADIOT, A. RAILLIET, H. VALLÉE.

PROFESSEURS

Anatomie descriptive des mammifères domestiques	MM. BOURDELLE.
Physiologie, thérapeutique générale, matière médicale. . . .	MAIGNON.
Physique et chimie médicales, toxicologie, pharmacie. . . .	NICOLAS
Parasitologie et maladies parasitaires, clinique ; histoire naturelle médicale.	HENRY.
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique ; sémiologie et propédeutique ; jurisprudence.	ROBIN.
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, clinique ; anatomie chirurgicale, médecine opératoire et ferrure. . . .	COQUOT.
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique ; médecine opératoire, obstétrique.	MOUSSU.
Pathologie générale et microbiologie, maladies microbiennes et police sanitaire, clinique.	PANISSET.
Histologie et embryologie, anatomie pathologique, inspection des denrées alimentaires ; autopsies,	PETIT.
Hygiène et agronomie ; zootechnie et économie rurale.	DECHAMBRE

CHEFS DE TRAVAUX

MM. DELMER.

LEBLOIS.

LETARD.

LESBOUYRIES

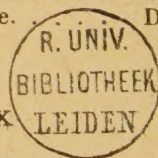
MM. MONVOISIN.

MOUSSU (R.).

PETIT (M.),

VERGE.

La Faculté de Médecine et l'École Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.



A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

Mère, sous ton regard de tendresse interdit,
Non, tu ne savais pas, je ne t'ai jamais dit,
Jene me suis jamais dit peut-être à moi-même
,C'est quand on a perdu qu'on sait comment on aime)
Non, je ne savais pas, je ne dirai jamais
De quelle âme de fils, ô mère, je t'aimais !

(LAMARTINE, *Jocelyn*.)

A MON PÈRE

LE PROFESSEUR JOSÉ JANUARIO CARNEIRO

*Je rends un hommage affectueux
et filial au dévouement inlassable
avec lequel vous vous êtes consacré,
durant près d'un demi-siècle, à l'œuvre
si belle d'instruire la jeunesse.*

A MES SCEURS ET A MES FRÈRES

MEIS ET AMICIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. VALLÉE

Membre de l'Académie de Médecine

Commandeur de la Légion d'honneur

Membre du Conseil supérieur d'Hygiène publique de France

Directeur du Laboratoire de Recherches du Ministère de l'Agriculture

*Nous lui dédions cette thèse comme
un humble témoignage de notre pro-
fonde reconnaissance et de notre
grande admiration. Son accueil, si
large et si bienveillant, ses conseils
judicieux ont fait de notre séjour
dans son laboratoire la période la
plus profitable et la plus agréable de
notre carrière d'étudiant.*

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. BRUMPT

Membre de l'Académie de Médecine
Officier de la Légion d'honneur

*Il nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de notre thèse. Nous le
prions de croire à l'hommage de
notre respectueuse reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. PANISSET

Chevalier de la Légion d'honneur
Membre du Comité des Epizooties
Auditeur au Conseil supérieur d'Hygiène publique de France
Adjoint au Directeur de l'Enseignement
de médecine vétérinaire exotique

*Avec le témoignage de notre recon-
naissance pour les conseils qu'il
nous a prodigués sans cesse au cours
de notre stage et l'expression de
notre admiration par son enseigne-
ment dont nous avons tiré le plus
grand profit.*

A SON EXCELLENCE

MONSIEUR MIGUEL CALMON DU PIN E ALMEIDA

Ministre de l'Agriculture
Industrie et Commerce des Etats-Unis du Brésil

A MONSIEUR LE PROFESSEUR E. NICOLAS

Directeur

ET

A TOUS LES MAITRES
DE L'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

A TOUS MES MAITRES DE L'ECOLE SUPÉRIEURE
D'AGRICULTURE ET MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
DE RIO DE JANEIRO

Hommage respectueux.

A MONSIEUR P. RINJARD

Chevalier de la Légion d'honneur
Chef de Services au Laboratoire de Recherches

*Il nous a guidé pas à pas dans les
dédales de la technique du labora-
toire ; nous lui en témoignons une
affectueuse gratitude.*

Au moment de terminer mon stage de perfectionnement et à la veille de revoir ma chère patrie lointaine, la joie que j'éprouve est mêlée du regret de quitter la France. France, mot magique, pays enchanteur que l'on m'apprit à aimer dès l'enfance, où l'accueil qui m'a été fait n'a rien enlevé à l'idée grandiose que je me faisais de ce pays dont le passé et le présent sont aussi glorieux.

ESSAIS
SUR LE
DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE
DU CHARBON BACTÉRIIDIEN

INTRODUCTION

Parmi les sujets dont nous nous sommes plus particulièrement occupés pendant notre stage de perfectionnement d'études en France, nous avons placé en première ligne le diagnostic bactériologique des maladies contagieuses.

En effet, la réussite d'une entreprise de traitement et de prophylaxie d'une maladie contagieuse dépend surtout d'un diagnostic sûr, posé de bonne heure.

Dans les pays d'élevage extensif comme le Brésil, où la prévention des grand fléaux des troupeaux est à l'heure actuelle la préoccupation principale du vétérinaire, cette question acquiert une importance considérable.

Lorsqu'une épizootie éclate, avant de formuler les mesures de prophylaxie, il est nécessaire de préciser à quelle maladie on a affaire ; il faut pouvoir établir un diagnostic sûr, puisque les moyens à mettre en œuvre ne sont pas les mêmes selon les maladies.

Après les mémorables travaux de Pasteur, les procédés du laboratoire ont apporté une aide inestimable à la clinique. Dans les laboratoires on peut très souvent préciser la nature d'une maladie et aujourd'hui la clinique ne saurait exister sans l'aide précieuse que lui apportent les moyens du diagnostic expérimental.

En médecine vétérinaire les méthodes expérimentales employées, en ce qui concerne le diagnostic des maladies infectieuses, ont des points d'analogie avec celles utilisées en médecine humaine ; elles procèdent des mêmes modes de réaction de l'organisme, mais dans l'une et dans l'autre médecine les procédés utilisés ne sont pas toujours les mêmes.

S'il est vrai que certains moyens dont se sert le médecin ne peuvent pas être utilisés par le vétérinaire, en ce qui concerne les maladies contagieuses des animaux, celui-ci dispose de moyens qui lui rendent la tâche aisée et lui permettent d'intervenir d'une façon efficace.

Le vétérinaire pourra sacrifier un animal au cours d'une épizootie, en faire l'autopsie et opérer les prélèvements nécessaires ; ici le point essentiel est le point de vue économique ; il faut assurer le diagnostic pour dicter les règles de prophylaxie.

On ne saurait trop insister sur l'intérêt d'un diagnostic sûr en ce qui concerne les maladies microbiennes.

Cette nécessité explique l'importance que l'on attache aujourd'hui aux recherches relatives au diagnostic de ces grands fléaux de l'élevage.

C'est pour cette raison qu'il nous paraît intéressant

d'étudier ici la question du diagnostic bactériologique du charbon bactérien. Après une mise au point de la question à l'heure actuelle, nous exposerons nos recherches personnelles et nous essaierons d'établir des conclusions inspirées des faits établis par les chercheurs qui ont étudié la question avant nous, et des constatations qui se dégagent de nos propres recherches.

CHAPITRE PREMIER

La fièvre charbonneuse (charbon bactérien, sang de rate ou anthrax) est une zoonose depuis longtemps connue. Les dommages qu'elle a causés, sa prévention par la vaccination pasteurienne, ont beaucoup contribué à vulgariser sa connaissance.

Il n'est peut-être pas de maladie dont l'aire de diffusion soit plus étendue que la fièvre charbonneuse ; on sait qu'elle est répandue sur tous les points du globe bien que les documents de la géographie médicale soient encore fort incomplets.

L'agent de la fièvre charbonneuse est un bacille qui a été découvert en 1850 par Davaine et Rayer dans le sang de moutons morts du charbon. C'est Davaine, qui en 1863 affirme son rôle spécifique dans l'étiologie du charbon et le baptise « bactérie charbonneuse ».

Ce sont les premiers travaux de Pasteur sur la question (1876) qui laissent entrevoir la possibilité de cultiver la bactérie en milieu artificiel ; c'est ensuite que le pouvoir pathogène spécifique de la bactérie charbonneuse a été établi.

La belle série des travaux de Pasteur et de ses disciples sur les points essentiels de l'étiologie du char-

bien, aboutit à la prophylaxie par les vaccinations basées sur le principe de l'atténuation du virus.

La bactéridie charbonneuse est un bâtonnet long de 5 à 10 u sur 1 u,5 de largeur, immobile, isolé ou groupé en chainettes formées de 2 à 3 éléments semblables, séparés par un intervalle imperceptible à l'examen à l'état frais ; on la découvre dans tous les tissus, sécrétions et excréctions de l'organisme malade, en abondance variable selon la période de l'infection. Dans le corps de l'animal la bactéridie est entourée d'une capsule décelable par des méthodes spéciales de coloration (1).

Coloration. — La bactéridie se colore par toutes les couleurs d'aniline ; elle se colore nettement par la méthode Gram.

Après coloration les bacilles présentent le même aspect qu'à l'état frais, avec cette particularité que chaque article bacillaire offre des extrémités assez nettement coupées et légèrement renflées, d'où l'apparence « en tige de bambou » des chainettes observées.

Conditions de sporulation de la bactéridie. — *Résistance.* — La sporulation de la bactéridie charbonneuse n'a lieu que dans certaines conditions déterminées : la température doit être comprise entre 16 et 42 degrés

• Méthode de coloration des capsules (double coloration). Colorer à chaud les frottis fixés par le liquide de Ziehl. Laver largement à l'eau. Décolorer à l'alcool-fluorescéine à 1 o/o pendant deux à trois minutes. Laver à l'eau et, puis rapidement à la solution à 1 pour 10.000 de carbonate de potasse. Colorer au bleu de Borrel pendant cinq minutes. Différencier par traitements successifs à l'acide acétique à 1 o/o, à l'eau, à l'alcool absolu, au xylol.

Les bacilles sont colorés en bleu et les capsules en rouge (Pianeso).

(la température optimum étant aux environs de 30°); les spores ne se forment que si la bactéridie se trouve en contact avec l'oxygène libre ; elles ne peuvent prendre naissance en son absence, ni en présence de l'oxygène combiné. Cela explique pourquoi les spores ne se développent pas dans le cadavre d'un animal ; dès que le cadavre est ouvert, l'air y pénètre et permet la sporulation. Ainsi les spores ne se forment jamais sur le corps de l'animal vivant.

Dans les cultures, dès que le milieu a cessé d'offrir à la bactéridie des conditions favorables à sa multiplication par division, la sporulation commence ; elle ne se produit que dans un milieu de culture approprié.

Une bactéridie ne produit qu'une seule spore ; cette spore se montre sous l'aspect d'un corps ovoïde, réfringent, occupant l'intérieur du bâtonnet ; sa coloration n'est pas toujours facile (1).

La bactéridie charbonneuse sous sa forme mycélienne est très sensible aux influences extérieures (chaleur,

1. Coloration des spores (Méthode de Möller).

a) Délayer dans une gouttelette d'eau une très petite quantité de culture sur gelose du bacille du charbon, laisser sécher, fixer par l'alcool absolu.

b) Faire agir pendant dix minutes une solution d'acide chromique à 5 o/o, laver avec grand soin à l'eau courante.

c) Colorer à la fuchsine de Ziehl à chaud jusqu'à émission de vapeurs ; laver. Renouveler trois ou quatre fois.

d) Différencier par la solution aqueuse à 2 o/o de chlorydrate d'aniline, quelques secondes ; décolorer à l'alcool absolu.

e) Colorer les bactéridies par la solution aqueuse de bleu de méthylène ;

Les spores se montrent colorées en rouge et les bactéridies en bleu.

lumière, produits chimiques) ; au contraire, la forme sporulée est infiniment plus résistante.

La bactéridie proprement dite, dans les cultures ou dans le sang frais, succombe à une température de 55 degrés pendant quarante minutes, de 50 degrés pendant une heure ; une température de 75 degrés la détruit en deux à quatre minutes ; le même résultat est obtenu en une minute à la température de 80 degrés.

Les spores supportent la chaleur humide à 95 degrés pendant environ dix minutes et résistent trois à quatre minutes à 100 degrés ; la chaleur humide n'agit sur la spore en toute certitude qu'à 100-105 degrés.

En chaleur sèche elles résistent quelques heures à 120 degrés.

La dessiccation reste sans effet sur la spore et elle est médiocrement efficace vis-à-vis de la bactéridie.

Les bactéridies résistent peu à l'influence des antiseptiques. Bien que les spores présentent une résistance considérable aux produits chimiques, toutes les spores des diverses races de bactéridies ne sont pas également résistantes à ces agents.

Il est des spores qui perdent leur faculté germinatrice après un séjour de deux à trois jours dans une solution de phénol à 5 0/0, tandis que d'autres peuvent s'y conserver pendant quarante jours. Cela permet d'employer souvent les spores charbonneuses pour vérifier l'efficacité d'un désinfectant.

Dans le sol, dans les couches profondes, à l'abri de l'air et de la lumière, les spores se conservent très longtemps.

Dans l'eau la spore résiste plusieurs mois ; elle

résiste intacte à l'influence de la putréfaction tandis que le bâtonnet se détruit rapidement.

Certaines bactéries (bacille pyocyanique, streptocoque, bacille coli, etc.), mélangées à des cultures bactériennes, à doses convenables, neutralisent ses effets pathogènes. Le bacille pyocyanique seul est aussi antagoniste *in vivo* de la bactérie charbonneuse.

Diagnostic. — La fièvre charbonneuse se traduit, soit dans la forme aiguë, soit dans la forme suraiguë, par des symptômes variables, ce qui rend le diagnostic clinique très délicat.

Dans la première forme le diagnostic paraît plus facile, mais la maladie peut encore prêter à confusion avec les troubles digestifs graves, certaines intoxications, principalement l'empoisonnement par l'arsenic, des coliques banales et des infections comme la septicémie hémorragique et les piroplasmoses. Dans certains pays, dits pays à charbon, les praticiens expérimentés posent plus facilement le diagnostic. Cependant dans bien des cas, ils sont fort embarrassés. Sur le cadavre, il est possible d'établir le diagnostic avec plus de facilité. Il est des lésions telles que l'altération du sang et la tuméfaction de la rate, qui ne sont jamais défaut ; mais ces lésions se trouvent dans les piroplasmoses où la rate est également hypertrophiée et le sang mal coagulé.

Bien que l'examen et les caractères des lésions soient d'une grande signification, l'autopsie ne permettra jamais qu'une quasi certitude.

Dans son dernier rapport sur le fonctionnement du « Laboratoire de recherches du service d'élevage au

Maroc », en parlant du diagnostic des maladies microbiennes, tel qu'il est effectué, au laboratoire, H. Velu écrit :

« L'utilité du diagnostic bactériologique a été particulièrement mise en évidence à propos du charbon bactéridien. Il a été donné de constater qu'il était impossible dans les conditions de la pratique courante et sans examen du laboratoire, de différencier le charbon bactéridien des piroplasmoses. Il est cependant nécessaire pour la prophylaxie de ces affections de les distinguer », question capitale, ajouterai-je, pour ma patrie.

Le diagnostic bactériologique, seul, peut permettre d'assurer l'existence de la fièvre charbonneuse ; il est indispensable chaque fois qu'on suspecte le charbon et qu'un diagnostic sûr est nécessaire.

Examinons quels sont les procédés dont dispose le bactériologiste pour établir le diagnostic du charbon bactéridien.

1) *Examen direct.* — Quand l'autopsie est pratiquée aussitôt après la mort, la recherche de la bactérie dans le sang ou dans la pulpe des organes permet de reconnaître la maladie. Pour pratiquer cet examen on procède de la façon suivante :

On prélève du sang aseptiquement à l'aide d'une pipette et avec les précautions d'usage, soit dans un vaisseau, soit de préférence dans le cœur, dont la superficie est cautérisée préalablement.

On procède à l'examen par voie humide et par voie sèche.

Pour l'examen par voie humide on dépose sur une lame une goutte de sang et on recouvre avec une lamelle sur laquelle on exerce une faible pression de façon à étaler le liquide dans le but d'obtenir une couche mince ; on examine au microscope avec l'objectif 8 ou 9, oculaire I ou II, miroir concave et avec l'emploi du diaphragme.

Les globules rouges se montrent gonflés, déformés et agglutinés par paquets ; au milieu de ces globules on remarque la présence de la bactériodie sous forme de baguettes dépourvues de mobilité propre. Pour compléter les observations on a recours à l'examen par voie sèche.

On dépose une goutte de sang sur une lame et on l'étale avec l'extrémité de la pipette ; on dessèche à une chaleur douce soit en plaçant la lame sur une platine de Radais ou de Koch chauffée à 45°, soit en la maintenant au-dessus de la flamme du bec Bunsen à une certaine hauteur ; on fixe la préparation en la passant rapidement, le frottis en haut, deux ou trois fois sur la flamme du bec de Bunsen ou en versant sur la lame quelques gouttes d'alcool-éther qu'on laisse évaporer.

Pour la coloration on emploie la méthode de Gram (1). Les bactériodies sont colorées en violet foncé et leurs particularités morphologiques apparaissent nettement.

1. Méthode de Gram. Technique de coloration.

a) Colorer les frottis fixés pendant trente à soixante secondes avec le violet de gentiane phéniqué.

b) Rejeter l'excès de matière colorante et sans laver, recouvrir la

Les frottis obtenus avec les produits de raclage d'une coupe de rate ou d'autres organes, et colorés par la méthode de Gram, montrent au lieu de bacilles isolés ou de courtes chaînettes, de longues chaînes composées de plusieurs éléments.

Ce procédé d'examen bien que plus précis que la simple autopsie ne fournit jamais un résultat sûr ; les causes d'erreurs sont plus probables encore quand il est pratiqué longtemps après l'ouverture du cadavre. On ne trouve plus alors que des rares bactériidies dans les préparations où elles sont mélangées à d'autres microorganismes. Le bacille du charbon ne se sporule pas dans les tissus, il y meurt très rapidement ; d'autre part, il existe des bacilles dont la morphologie prête à confusion avec la bactériдие de Davaine (bacilles anthracoides). Bessemans et Leynen racontent qu'au cours d'examen de sang et de pièces provenant d'animaux suspects de charbon, ils ont été souvent frappés de la présence de microorganismes ressemblant à tel point à la bactériдие charbonneuse que l'inoculation aux animaux de laboratoire était nécessaire pour assurer le

préparation par le liquide de Gram ; laisser en contact une à deux minutes.

c) Verser l'excès.

d) Décolorer par l'alcool acétone quelques secondes ; interrompre dès que le réactif ajouté en excès n'entraîne plus des stries violettes.

e) Laver à l'eau.

f) Colorer le fond avec la solution de safranine trente à soixante secondes.

g) Laver à l'eau.

h) Examiner à l'immersion.

diagnostic ; la différenciation de ces bacilles est plus facile à résoudre d'après certains caractères quand on a les germes en culture pure, mais dans la pratique le plus souvent le germe saprophyte et l'élément pathogène se présentent dans le matériel soumis à l'examen, associés à d'autres microorganismes, ce qui rend le diagnostic immédiat difficile et même impossible.

Avant de connaître les travaux de Bessemans et Leynen, nous-mêmes avons été souvent frappés de cette difficulté du diagnostic bactérioscopique.

Pour ces raisons, notamment quand on opère sur des matières recueillies quelque temps après la mort il est prudent de ne pas s'en tenir au diagnostic basé sur le simple examen microscopique.

En cas de présence de bacilles suspects, l'examen direct du matériel coloré ne permet point de conclure affirmativement, car les différentes colorations ordinaires, y compris la méthode de Gram, à laquelle nombre d'éléments bactériadiens réagissent d'ailleurs irrégulièrement, ne procurent aucune donnée précise sur la nature de ces bacilles.

En ce qui concerne la coloration des capsules, il faudrait que toute bactéridie charbonneuse présentât une capsule pour que la présence de celle-ci put constituer un élément, une certitude, mais il n'en est point ainsi ; il y a des bactéridies charbonneuses chez lesquelles la capsule fait défaut.

Au surplus, une constatation négative n'ayant aucune valeur en l'espèce qui nous occupe, le diagnostic de la maladie exige la recherche complète, l'isolement et

l'identification de l'agent du charbon ; pour cela on a recours aux cultures et à l'inoculation.

Culture. — La culture est le moyen complémentaire indispensable de l'examen direct, c'est le seul procédé qui puisse permettre un diagnostic sûr dans certains cas. Mais ici le point délicat est le prélèvement ; quand les organes ou le sang sont recueillis aussitôt après la mort, on peut les utiliser pour les ensemencements ; les caractères des cultures pures et leur examen microscopique permettent de poser un diagnostic sûr ; mais dans les cas où l'on est loin du laboratoire, la difficulté est la même que pour l'examen direct ; les bactériidies ne résistent pas longtemps dans les matières prélevées et les cultures n'apportent pas toujours la solution recherchée.

Nous verrons maintenant comment on doit pratiquer les cultures dans les cas où l'on dispose d'un matériel frais à ensemer et nous reviendrons sur la question du choix du matériel à prélever alors qu'on est éloigné du laboratoire.

La bactériдие charbonneuse se cultive facilement dans tous les milieux usuels de cultures, mais elle possède un aspect caractéristique sur certains d'entre eux. Le développement ne s'effectue normalement et abondamment qu'en présence de l'oxygène ; la bactériдие est un aérobie de nécessité.

La température optimum est entre 30 à 40 degrés, mais le développement s'opère de 15 à 43 degrés, la sporulation n'est possible qu'entre 16 et 42 degrés.

Bouillon ordinaire. — Au bout de vingt-quatre heures

des flocons blancs se forment à la surface du liquide et le long des parois du tube ; après quelques jours, ces flocons tombent au fond du tube ; le bouillon reste limpide. Si on prélève une trace de ce dépôt, on y constate la présence de nombreuses spores. En quelques cas exceptionnels la culture s'effectue en troublant uniformément le bouillon.

Gélatine. — Par piqûre le développement est caractéristique ; il se forme après vingt-quatre heures de petites colonies constituées par un centre plus ou moins compact avec des bords blancs grisâtres, irréguliers, finement dentelés. Après trente-six heures les colonies sont plus développées et sont constituées par un amas qui envoie des prolongements ; examinés à faible grossissement, elles présentent un aspect que rappelle celui de la crinière d'un lion. Toutefois les colonies n'ont pas toujours un aspect caractéristique. En tous les cas s'opère la protéolyse du milieu.

Gélose. — En surface inclinée il se développe en vingt-quatre heures une strie épaisse, grisâtre qui devient plus étendue et plus sèche, avec des bords finement dentelés. Les colonies ont le même aspect que sur la gélatine mais moins caractéristique. Les prolongements rappelant la crinière de lion sont très visibles dans les cultures sur gélose dans les boîtes de Roux.

Sérum. — Colonies semblables et mêmes résultats que sur gélatine.

Pomme de terre. — La bactériidie forme un enduit blanchâtre, épais et opaque, comparable à du velours blanc sali.

Lait. — Le lait coagulé du troisième au cinquième jour est ensuite peptonisé ; il vire au jaune blanchâtre.

La gélose et le bouillon sont les milieux utilisés dans la pratique courante.

Inoculation. — L'inoculation aux animaux de laboratoire est le procédé le plus rigoureux pour établir un diagnostic du charbon.

De nombreux animaux sont sensibles à l'inoculation de la bactériémie charbonneuse ; le lapin et le cobaye sont réceptifs et représentent les réactifs de choix.

Dans le cas de produits charbonneux purs, l'inoculation, sous la peau d'un cobaye, de quelques gouttes de sang ou plus simplement d'une aiguille chargée de virus, sera suffisante pour provoquer les symptômes et les lésions du charbon. Jamais on n'observe chez l'animal infecté expérimentalement la pustule maligne qui se développe chez l'homme.

Dix à quinze heures après l'injection, le point d'inoculation devient le siège d'un œdème plus ou moins étendu ; les ganglions voisins s'hypertrophient et la température s'élève de 1 à 2 degrés.

Jusqu'à vers la vingt-quatrième ou quarante-huitième heures l'animal conserve les apparences de santé, quand, rapidement, les bactériémies envahissant la circulation, l'état général s'aggrave ; l'animal devient dyspnéique, tombe dans le coma et meurt après quelques convulsions.

L'autopsie montre une série de lésions.

Au point d'inoculation on voit un œdème blanc,

gélatineux et assez étendu, dans lequel les frottis montrent des bactéridies en abondance.

Le sang est noir et se coagule difficilement ; son examen révèle les altérations globulaires classiques et la présence de la bactéridie.

Une prise de sang, aseptique, dans le cœur permet d'obtenir des cultures pures de charbon si l'on pratique l'autopsie aussitôt après la mort.

La lésion microscopique la plus caractéristique est l'hypertrophie prononcée de la rate dont la pulpe est friable et rouge foncé ; c'est à cette lésion que la maladie doit son nom de sang de rate.

Les reins, le foie et les poumons sont congestionnés et gorgés de sang ; dans tous les viscères les bactéridies pullulent.

Dans les cas assez rares, où l'on dispose d'un matériel frais, l'ensemencement des produits, et dans certains cas douteux l'inoculation sous la peau du cobaye suffisent alors pour bien établir le diagnostic plus ou moins rapidement.

Mais dans la pratique ordinaire les produits à examiner sont en état de putréfaction plus ou moins avancée et la présence d'un grand nombre de microbes différents de la bactéridie fausse le diagnostic.

L'inoculation sous-cutanée ne peut être utilisée comme moyen de diagnostic que si l'on dispose d'un matériel frais, exempt des microbes de la putréfaction.

Lorsque l'on soupçonne la présence du vibrion séptique dans le produit à inoculer il est nécessaire, mettant à profit la doctrine de Besredka, de recourir à

l'inoculation par scarification. Par ce mode l'évolution du vibrion est entravée et seule la bactériodie évoluant, infecte l'animal. Mais il ne faut pas oublier que les inoculations par scarification sont très souvent infidèles non par défaillance de la méthode, mais parce que la bactériodie disparaît vite des produits en putréfaction. Le résultat de l'inoculation peut donc être faussé si la putréfaction détruit les tissus charbonneux ou s'il y a des associations microbiennes qui diminuent la réceptivité du sujet inoculé. D'autre part, l'animal peut succomber à des septicémies autres dont la période d'incubation est plus courte que celle de la fièvre charbonneuse.

*
* * *

Il se dégage de ces considérations une remarque sur laquelle nous voulons insister ; c'est l'importance qu'il faut attacher aux conditions dans lesquelles se trouvent les produits dont on dispose en vue d'un diagnostic de laboratoire ; quel que soit le procédé employé, la question du matériel à prélever a une importance spéciale.

Nous sommes ainsi amenés à étudier les divers procédés qui ont été préconisés pour la récolte et l'envoi au laboratoire, des matériaux suspects de charbon, dans le but de les soumettre aux procédés du diagnostic bactériologique.

CHAPITRE II

Quand on veut être renseigné sur la nature d'une épizootie dont on soupçonne l'origine charbonneuse, il faut, avons-nous dit, le concours du laboratoire. Souvent éloigné, celui-ci devra recevoir des produits prélevés en bonne forme sur un cadavre.

Tous les produits qui proviennent d'animaux morts de charbon s'altèrent vite; cette altération entraîne, nous le savons, la disparition de la bactériodie de Davaine.

Nombre de bactériologistes se sont préoccupés de la question des produits à prélever et des moyens à utiliser pour les envoyer au laboratoire dans le but de rechercher la bactériodie. Le problème se posait de trouver un produit dans lequel, même longtemps après la mort, il soit facile de mettre en évidence l'agent du charbon.

Sous la direction des Forster, Jacobsthall et Pfersdorff ont étudié le procédé de diagnostic connu sous le nom de procédé strasbourgeois. Le procédé consiste essentiellement à plonger dans le sang charbonneux un corps poreux (brique, craie, papier filtre); le matériel ainsi recueilli est placé au fond d'un tube à essai,

sur un peu de coton. Quand la température est favorable, la sporulation se fait tandis que les microbes anaérobies n'évoluent pas.

A l'arrivée au laboratoire, on râcle le corps poreux dans du bouillon et de ce bouillon on fait desensemencements dans les divers milieux de culture. Les cultures ainsi obtenues sont chauffées à 62 degrés pendant deux minutes pour détruire les formes végétatives des microbes de souillure qui peuvent exister. Or les spores charbonneuses résistent à ce chauffage : les cultures chauffées et ensemencées permettront donc de déceler la bactériémie charbonneuse.

Jacobsthal et Pfersdorff en étudiant la méthode ont été conduits à imaginer un moyen capable de fournir aux germes, aussi rapidement que possible, les meilleures conditions de sporulation.

Leur procédé consiste à imprégner des baguettes de plâtre humides, avec le sang suspect de renfermer des bactériémies.

Ces expérimentateurs ont trouvé que le « procédé strasbourgeois » s'est toujours montré supérieur à l'examen fait avec le sang ou la pulpe de rate. Ils ajoutent qu'alors que le seul examen microscopique permettait de reconnaître, en Allemagne, 280 cas de charbon, ce nombre était porté à 377 par l'emploi de la baguette de plâtre.

D'autres expérimentateurs ont confirmé l'avantage des matériaux poreux et humides. Eberle et Schüller ont proposé de remplacer les baguettes de plâtre par des morceaux ou des petits rouleaux de papier filtre.

Engler et Müller d'abord, Engler ensuite, ont re-

cherché parmi les substratums poreux ceux qui conviendraient le mieux pour la sporulation de la bactériodie et à ce point de vue ils préfèrent la terre cuite et la craie au plâtre ; le papier de filtre donne des résultats beaucoup moins satisfaisants.

En raison de la facilité avec laquelle la craie absorbe l'humidité, elle devient friable, se réduit en morceaux pendant le transport, et reste ainsi inutilisable. C'est pourquoi les auteurs donnent leur préférence à la terre cuite.

Müller et Engler préconisent l'emploi d'un fragment de pot à fleurs stérilisé par l'action de l'eau bouillante pendant cinq minutes. La face rugueuse est enduite d'une couche épaisse de sang pour la recherche de la bactériodie ; sur la face lisse on étale une couche mince de sang pour obtenir une sporulation facile.

La question est reprise par Bozzelli.

Celui-ci conseille, pour les prélèvements et le transport du sang ou des sucres d'organes, supposés infectés de charbon, l'emploi des tiges sèches de la fêrue, qui sont très poreuses ; l'intérieur de cette tige normalement ne contient pas des microbes aérobie ni anaérobies. On fend une de ces tiges longitudinalement et on dépose sur les surfaces poreuses, et très absorbantes, le matériel à expédier (sang, pulpe, rate, etc...). Quand tout est absorbé par les fibres sèches, on ajuste l'une sur l'autre les deux surfaces, on ligature le tout avec une ficelle et on envoie au laboratoire.

D'après Bozzelli, dans ces conditions, le sang infecté s'est montré cultivable et virulent après une quinzaine de jours de conservation.

Bien que ces procédés aient été préconisés par quelques expérimentateurs, il ne nous paraît pas qu'ils soient d'un bon emploi dans la pratique courante. Il faut se procurer du matériel et ces prélèvements ne sont pas très faciles à faire. Pratiquement le vétérinaire ne sera pas toujours pourvu de ces objets ; il faut qu'il puisse incessamment prélever sur le cadavre les pièces devant servir à un examen ultérieur, et l'on a constaté que le sang et la rate se prêtent peu à cet examen ; d'autre part, la manipulation de ces matériaux dans le laboratoire n'est pas toujours commode.

D'autres procédés encore ont été préconisés.

D'après Frey une préparation bien faite, séchée à l'air en dehors de la lumière directe et de la chaleur, pourra servir pour la culture et pour l'examen. Un petit morceau de gaze propre, stérile, traitée comme la préparation constitue, d'après l'auteur américain, un moyen excellent d'envoi ; mais Frey conseille un autre procédé plus pratique, qu'il considère comme le procédé de choix :

« Couper l'oreille aux trois quarts de sa longueur à compter de sa pointe, envelopper dans du papier, puis dans un coton ; l'oreille est tardivement envahie par les bactériidies de la putréfaction d'origine intestinale ; son cartilage résiste au processus de destruction ».

En réalité, la technique de Frey s'inspire des travaux de Ciuca et Stoicescu qui, dès 1909, démontrent avec quelle facilité la peau et les poils des sujets infectés de charbon, recèlent les spores bactériidiennes. Jus-

qu'à quatorze mois après la mort du sujet, celles-ci restent expérimentalement décelables.

A noter aussi la technique de Ciuca et Fenea qui signalent tout l'intérêt de l'examen des fèces qui demeure utilisable jusque chez des sujets putréfiés.

Toutes les méthodes que nous venons d'énumérer présentent des défaillances plus ou moins graves. Parmi elles, la méthode préconisée par Ciuca et Stoïnescu et par Frey comme la méthode de choix, nous semble la meilleure et la seule utilisable dans la pratique. Le morceau d'oreille coupé paraît bien se conserver et l'on y pourra trouver la bactériodie pendant un certain temps, à la condition que le matériel soit pris comme le préconisent les auteurs du procédé.

*
* *

En Allemagne, la loi du 25 juillet 1911, prévoit l'obligation d'un examen bactériologique dans tous les cas de charbon.

D'après les prescriptions de cette loi l'examen doit être pratiqué dans un laboratoire spécial dans le cas de charbon du cheval et d'autres animaux, si l'autopsie et l'examen microscopique n'ont donné aucun résultat ou s'il y a des divergences d'avis entre le propriétaire de l'animal et le vétérinaire.

La question du matériel d'envoi pour l'examen ayant été toujours un sujet digne d'attention pour les bactériologistes, à cause des divergences des diagnostics, après la mise en vigueur de la loi citée, Wulff s'est préoccupé de trouver des moyens plus pratiques pour

les prélèvements, le transport et l'examen des échantillons.

De ses recherches, Wulff conclut que la moelle des os remplit toutes conditions désirables. Dans toutes ses expériences, il a pu prouver, au moyen de la culture, la présence de la bactériodie charbonneuse dans la moelle osseuse, même un certain temps après la mort de l'animal, à une époque où la preuve au moyen d'autres organes était devenue impossible.

Les travaux de Wulff ont constitué la base de ce nouveau moyen de diagnostic; ils avaient pour but de trouver quelles étaient les parties de l'organisme qui se prêtaient à la recherche du charbon du point de vue de la coloration et des cultures. Ces expériences portent sur deux animaux sur lesquels Wulff a obtenu les résultats suivants :

1^o *Bœuf*, 6 ans, mort le 10 mars 1912 et dépecé le 13 mars. A l'autopsie on constate : tumeur de la rate, sang épais, non coagulé.

Wulff conserve des morceaux de poumon, de foie, de muscle, etc.; Il prend aussi des grosses masses musculaires avec les os d'un membre antérieur et d'un membre postérieur, et les garde au laboratoire, à la température de la chambre; les deux autres membres sont enfouis.

Pour l'examen de la moelle osseuse, il commence par prendre le métacarpien; après sept jours il utilise le métatarsien gardé à la température de la chambre.

Le résultat a été :

Dès le premier jour d'envoi (4 jours après la mort de l'animal) l'examen par le procédé des cultures a révélé la présence du charbon dans les organes et dans la moelle osseuse; à l'examen suivant (7 jours), le résultat était déjà négatif pour le foie, les reins et les muscles; dans la moelle osseuse il se trou-

vait une grande quantité de colonies, qui étaient moins abondantes dans le sang et dans la rate.

Il n'y a pas de sporulation.

Onze jours après la mort de l'animal on ensemence la moelle du métatarsien et du métacarpien et on obtient une grande quantité de colonies; douze jours après la mort de l'animal les ensemencements de la moelle osseuse du tibia sont positifs. Le 24 mars (15 jours après la mort de l'animal) l'expérimentateur renouvelle ses essais et obtient une grande quantité de colonies de charbon dans tous les os examinés jusqu'à ce jour.

Le 23 mars les os qui avaient été enfouis du 13 au 23 (c'est-à-dire pendant 11 jours) sont repris et leur examen montre la présence d'un grand nombre de colonies charbonneuses.

Dans ce cas Wulff a pu encore, ce jour-là, trouver la bactériémie dans la veine de l'oreille et dans la rate, mais comme ces dernières pièces avaient été gardées dans des conditions anormales, à une température très basse, la décomposition étant peu avancée, ces essais furent abandonnés le quinzième jour après la mort de l'animal. Seuls les essais sur la moelle osseuse du fémur, qui avait été enfoui pendant dix huit jours, montrent la présence de la bactériémie; les ensemencements de la moelle du métatarsien montraient encore la présence de l'agent du charbon après vingt-neuf jours d'enfouissement.

2^e Vache, abattue le 14 mars.

L'examen de la viande, pratiqué le 16 mars, à l'Institut des maladies contagieuses, a révélé la présence du charbon.

Wulff examine le cadavre le 19 mars.

Dans les premiers jours, il trouve la bactériémie dans les organes, mais le 24 mars, l'examen pratiqué sur le foie, les muscles, le cœur et les poumons a été négatif; les ensemencements de la moelle osseuse, des reins et de la veine de l'oreille donnent un grand nombre de colonies.

Les os ont été alors enfouis; dix-neuf jours après la mort de l'animal, l'examen de la moelle osseuse est positif.

Dans d'autres cas l'auteur a pu trouver la bactériémie dans la moelle osseuse quelques semaines après la mort de l'animal. Dans plusieurs échantillons qui lui furent

adressés provenant de cas suspects de charbon chez les ruminants et chez le porc, Wulff a constaté la présence du bacille du charbon dans la moelle des os longs; dans un cas où il lui manquait des os longs il a pu se servir avec succès de l'os iliaque.

L'auteur considère finalement comme établi que c'est dans les os que les bacilles résistent le plus longtemps à la putréfaction et il conclut que l'on doit toujours avoir recours à l'examen de la moelle pour le contrôle du diagnostic, dans les cas, en particulier, où il y a divergence d'avis entre le vétérinaire et le propriétaire de l'animal.

Wulff affirme aussi que l'examen de la moelle donne des résultats incontestables quand le sang et la rate ne peuvent plus être employés, et il conseille l'envoi du métatarsien ou du métacarpien pour l'examen bactériologique des produits suspects de charbon.

Cette étude a été reprise en Argentine par Marchisotti. Cet expérimentateur a pu trouver la bactériémie dans la moelle des os, chez des lapins morts de charbon expérimental, onze jours après la mort (ensemencements positifs sur gélose).

Chez le mouton, à une température de 18 à 24 degrés, Marchisotti a pu trouver la bactériémie dans la moelle osseuse, huit à dix jours après la mort de l'animal, tandis que trente-six heures après la mort le bacille ne pouvait être mis en évidence ni dans les organes, ni dans la cavité thoracique ou abdominale.

Par l'examen de la moelle osseuse, ce chercheur obtient, sur 94 analyses, 55 résultats positifs et 25 négatifs.

Marchisotti se montre, lui aussi, partisan de ce procédé d'envoi des pièces au laboratoire en vue du diagnostic de la fièvre charbonneuse ; il préconise l'envoi d'un os à moelle, recueilli de la façon suivante : on enlève la peau d'un membre, on désarticule un gros os à ses deux extrémités (les métacarpiens s'y prêtent bien) et on l'envoie au laboratoire.

Après Grabert et Marchisotti, Sani s'est aussi préoccupé du procédé recommandé par Wulff pour la recherche de l'agent du charbon.

Sani recommande la méthode du bactériologiste allemand ; ses recherches montrent que la moelle osseuse est un milieu extrêmement favorable au développement et à la conservation de la bactérie de Davaine. La composition chimique du tissu osseux et sa compacité, dit l'expérimentateur italien, opposent certainement une grande résistance à la putréfaction ; de sorte que la putréfaction anaérobie ne se fait sentir que tardivement sur les bacilles charbonneux dans la moelle osseuse.

En complet accord avec les expérimentateurs qui l'ont précédé, Sani pense que la méthode de Wulff devrait être adoptée de préférence à toutes les autres, dans les cas où le diagnostic doit être établi sur des cadavres en état de putréfaction avancée.

Les recherches postérieures en ce qui concerne d'autres infections microbiennes, ont montré l'intérêt pratique de ce procédé.

En effet, la question a été reprise par Truche, par Staub, pour d'autres affections. Et la méthode de dia-

gnostic par la recherche des agents infectieux dans la moelle des os est aujourd'hui de pratique courante dans quelques laboratoires pour le charbon et d'autres maladies.

Ainsi Truche s'occupant de la typhose aviaire a été amené à rechercher un moyen pratique de recevoir le matériel d'examen.

Les cadavres des animaux qui lui étaient envoyés venant de très loin, arrivaient en état de putréfaction avancée et il éprouvait souvent des difficultés sérieuses pour obtenir le microbe à l'état pur.

S'inspirant de ce qui se faisait pour la mise en évidence de la bactérie charbonneuse, Truche a recherché, systématiquement, le germe de la typhose aviaire dans la moelle osseuse ; chaque fois il l'a retrouvé à l'état pur.

Truche conseille aujourd'hui aux confrères qui le consultent pour cette affection de lui envoyer une patte désarticulée proprement à l'articulation tibio-tarsienne.

Avec les ensemencements de la moelle osseuse on obtient des colonies typiques du bacille de la typhose ; l'examen microscopique permet de s'assurer de la présence et de la pureté du germe recherché.

Staub a pu retrouver, par le même moyen, le coccobacille du choléra des poules.

Altara a voulu savoir combien de temps on pouvait trouver le germe du choléra aviaire dans la moelle osseuse.

Ses expériences, faites sur des poules et des cobayes

infectés naturellement et expérimentalement, lui ont permis de conclure :

a) Que la bactérie ovoïde est constamment présente dans la moelle osseuse des poules mortes de choléra naturel et expérimental et dans celle du cobaye mort de l'infection expérimentale ;

b) Que la bactérie ovoïde peut encore être obtenue en culture si le cadavre est en état de putréfaction avancée (30, 60 et 70 jours) par desensemencements d'une trace de moelle prélevée dans un os long ;

c) Que cette méthode de diagnostic par sa simplicité correspond parfaitement aux exigences scientifiques et pratiques ;

d) Que la bactérie ovoïde peut conserver entières ses qualités pathogènes dans la moelle osseuse.

D'après Oberlander la moelle osseuse est le matériel idéal pour l'examen microscopique et cultural du rouget et son emploi permet, en général, de poser un diagnostic sans recourir à l'inoculation.

D. Giovine a étudié dernièrement cette question. Il a opéré avec du matériel à différents états de putréfaction.

Ses recherches, qui montrent que la méthode de Wulff est pratique pour le diagnostic du rouget, lui permettent de conclure :

a) Que le bacille du rouget se trouve constamment et à l'état de pureté dans la moelle osseuse des porcs morts d'infection naturelle et des pigeons expérimentalement infectés.

b) Que le germe conserve dans la moelle osseuse sa

pureté et sa virulence pendant une période de trente jours, que le matériel ait été conservé en milieu sec ou humide.

c) Que la méthode de Wulff offre pour le diagnostic du rouget l'avantage d'une recherche facile du bacille dans la moelle osseuse, qui permet de l'isoler ou de prouver sa virulence, tandis que par d'autres moyens ces recherches sont difficiles ou même impossibles.

Giovine conseille de prélever un os pour le diagnostic bactériologique du rouget.

Au Laboratoire de Recherches du Ministère de l'Agriculture le procédé est systématiquement recommandé, notamment pour le diagnostic des charbons, du rouget, de la typhose aviaire et du choléra des poules, voire même de la peste aviaire, maladie due à un virus filtrable.

Au Laboratoire de Recherches du Service de l'élevage du Maroc, le procédé de diagnostic par l'examen de la moelle osseuse est de pratique courante.

Dans son dernier rapport sur le fonctionnement de ce laboratoire, H. Velu dit : « Les plus grands services ont été rendus par l'envoi au laboratoire d'un os long des animaux morts ou suspects de maladie infectieuse. La culture de la moelle osseuse a permis de faire tous les diagnostics de charbon bactérien et la plupart de ceux de pasteurellose, de salmonellose porcine et de choléra aviaire ».

Des 399 analyses faites dans ce laboratoire, 48 portent sur des produits suspects de charbon et ont été

faites par l'examen de la moelle osseuse. Elles se répartissent ainsi :

Culture de la moelle osseuse. — Pour le diagnostic de charbon bactérien du bœuf 30 dont 6 positives

—	—	mouton	7	—	4	—
—	—	cheval	3	—	1	—
—	—	porc	6	—	3	—
—	—	chèvre	2	—	1	—
Total.....			48	—	15	—

* * *

De la longue série de travaux publiés sur la question, il se dégage une conclusion sur laquelle il faut insister : tous les chercheurs sont d'accord pour affirmer que le procédé de diagnostic par la moelle osseuse est d'un grand secours au laboratoire quand on a affaire à des produits prélevés longtemps après la mort. La méthode est dans ces conditions le procédé idéal, car alors tous les autres moyens dont on dispose (exception faite pour le séro-diagnostic d'Ascoli, dont nous parlerons dans le chapitre suivant) sont impraticables.

RECHERCHES PERSONNELLES

Sous l'inspiration de M. le Professeur Vallée, nous avons repris la question du diagnostic du charbon bactérien au laboratoire.

Il s'agit d'un sujet dont on considère le grand intérêt pratique quand on opère dans un pays d'élevage extensif ; les laboratoires y sont souvent éloignés des

foyers de zoonoses et un diagnostic bien posé sera le seul moyen capable de permettre une entreprise de prophylaxie et de l'amener à de bons résultats.

Nos essais portent sur des produits recueillis sur un animal mort de charbon naturel et par la suite sur des animaux de laboratoire.

Il est indiscutable que dans des expériences de ce genre la température du milieu doit avoir une influence qui ne doit pas échapper à l'expérimentateur.

En effet, la présence de la bactériémie charbonneuse à l'état pur dans les produits prélevés sur les cadavres, est fonction du processus de putréfaction ; or, dans le développement des germes de la putréfaction on sait que le facteur température joue un rôle particulièrement important.

Aussi pour mieux préciser les conditions de nos essais nous avons eu soin de contrôler la température moyenne du milieu au moyen d'un thermomètre à maxima et à minima, placé à côté de la cage qui contenait notre matériel d'études.

PREMIÈRE OBSERVATION. — Notre première observation a été faite sur une phalange, expédiée au Laboratoire de Recherches par J. M. ; elle constituait un prélèvement fait sur une vache morte après trente-six heures de maladie et présentant les lésions du charbon.

La vache était morte le 1^{er} avril 1925. Le praticien qui avait autopsié l'animal croyait au charbon.

Le 1^{er} avril, nous avons examiné au laboratoire du sang prélevé sur cette vache et cet examen nous avait montré la présence de la bactériémie.

Le 4 avril, nous recevons une phalange de cette vache.

Nous employons la technique suivante :

Nous enveloppons la phalange dans du papier et nous la plaçons en dehors du laboratoire, à l'ombre, à côté d'un thermomètre où nous relevons la température chaque matin.

Le 20 avril (vingt jours après la mort de l'animal), nous prenons la phalange et après cautérisation de la superficie et ponction au trépan, nous ensemençons la moelle osseuse. Ces ensemencements sont faits dans du bouillon peptoné et sur gélose ; en même temps nous prenons un de ces tubes de bouillon ensemencé, duquel nous faisons un ensemencement sur gélose liquéfiée, chauffée à 100 degrés et refroidie à 45 degrés : cette gélose aussitôt ensemencée est versée dans une boîte de Roux, et les milieux ensemencés sont placés à l'étuve à 37 degrés.

Les cultures examinées après vingt-quatre et quarante-huit heures ont montré des colonies abondantes de charbon bactérien.

Après avoir fait ces ensemencements, nous reprenons la phalange, dont le pertuis a été obturé à la cire et replacée à l'extérieur. Le 29 avril, nous faisons un deuxième examen de la moelle osseuse, en procédant comme pour le premier.

Ce deuxième examen a été négatif ; nous n'y avons pas pu déceler la présence de l'agent du charbon.

Pendant le temps que la phalange était placée à l'extérieur (du 4 au 29 avril) le thermomètre nous a signalé des températures qui ont varié de + 5 à + 20 degrés.

Nous avons donc :

Vache morte le 1^{er} avril. Présence de la bactériodie charbonneuse.

Premier examen : moelle osseuse, fait le 20 avril 1925 (vingt jours après la mort). Positif.

Deuxième examen : moelle osseuse, fait le 29 avril 1925 (vingt-neuf jours après la mort). Il ne nous a pas été possible de déceler la bactériodie.

Il faut considérer ici que les phalanges ne sont pas les os conseillés pour cet examen. Wulff fait remarquer que les os longs, bien protégés par une paroi compacte, sont mieux défendus contre la putréfaction

que les os spongieux, comme les phalanges, très vascularisés.

Malgré cela l'examen de la moelle osseuse nous a permis de poser le diagnostic du charbon vingt jours après la mort de l'animal. D'autre part, pour notre deuxième examen, il faut considérer que la phalange était déjà ouverte depuis quelques jours, et cela avait pu faciliter le développement d'autres germes et hâter la disparition de la bactériémie.

DEUXIÈME OBSERVATION. — En raison de la difficulté d'obtenir des pièces provenant d'animaux morts de charbon naturel, notre deuxième essai a porté sur un lapin inoculé au laboratoire.

Comme on le verra, nous avons cherché tout d'abord le délai maximum pendant lequel la bactériémie peut être retrouvée dans le sang du cœur. Ensuite, quand la putréfaction avancée ne nous a plus permis d'isoler la bactériémie, nous nous sommes adressé à la moelle osseuse.

Le 25 avril, nous inoculons un lapin, sous la peau, avec une culture charbonneuse de vingt-quatre heures.

Ce lapin meurt le 26 avril 1925 ; son cadavre est laissé dans une cage en dehors du laboratoire ; un thermomètre est placé à côté de la cage.

Le 1^{er} mai (quatre jours après la mort), nous prenons l'animal et nous ouvrons la cavité thoracique sans pratiquer l'autopsie. Chaque jour nous prélevons du sang du cœur que nous ensemençons dans du bouillon et sur gélose.

Du 1^{er} au 8 mai, les cultures nous montrent toujours la présence de l'agent du charbon. Mais le 10 mai, nous ne pouvons plus prélever le sang du cœur ; les mouches attaquent l'animal qui est envahi par les germes de la putréfaction : la manipulation du cadavre n'est plus possible.

Le lapin est disséqué et nous prenons ses deux tibias et deux fémurs qui sont gardés à la même place que celle où se trouvait le cadavre.

Le 13 mai, nous pratiquons le premier ensemencement de la

moelle osseuse du premier fémur, nous y trouvons l'agent du charbon. Le 15 mai, nous obtenons encore des cultures du charbon avec la moelle osseuse du même fémur.

Le 16 mai, nous prenons un tibia : l'examen de sa moelle osseuse nous permet d'obtenir cette fois encore des cultures typiques de charbon. Le 19, l'examen du même tibia (qui avait été scié le 16) ne nous permet pas de trouver la bactériodie.

Le 20 mai, nous prenons le deuxième fémur : l'examen de sa moelle est positif : nous y constatons la présence de la bactériodie.

Le 22 mai, nous examinons la moelle du deuxième tibia : la présence de la bactériodie y est constatée.

Faute d'os, nous terminons les examens.

Du 26 avril, jour où le lapin est mort, jusqu'au 22 mai, date de notre dernier examen, le thermomètre nous accusait des températures comprises entre 5 et 29 degrés.

Nous avons eu alors pour ce lapin, le résultat suivant :

EXAMENS DU SANG

Premier examen sang du cœur le 1^{er} mai 1925 (5 jours après la mort). Positif.

Deuxième examen sang du cœur le 2 mai 1925 (6 jours après la mort). Positif.

Troisième examen sang du cœur le 4 mai 1925 (8 jours après la mort). Positif.

Quatrième examen sang du cœur le 5 mai 1925 (9 jours après la mort). Positif.

Cinquième examen sang du cœur le 6 mai 1925 (10 jours après la mort). Positif.

Sixième examen sang du cœur le 7 mai 1925 (11 jours après la mort). Positif.

Septième examen sang du cœur le 8 mai 1925 (12 jours après la mort). Positif.

EXAMENS DE LA MOELLE OSSEUSE

Premier examen moelle osseuse (1^{er} fémur) le 13 mai 1925 (18 jours après la mort). Positif.

Deuxième examen moelle osseuse (même fémur) le 15 mai 1925 (20 jours après la mort). Positif.

Troisième examen moelle osseuse (1^{er} tibia) le 16 mai 1925 (21 jours après la mort). Positif.

Quatrième examen moelle osseuse (même tibia ouvert antérieurement) le 19 mai 1925 (24 jours après la mort). Négatif.

Cinquième examen moelle osseuse (2^e fémur) le 20 mai 1925 (25 jours après la mort). Positif.

Sixième examen moelle osseuse (2^e tibia) le 22 mai 1925 (27 jours après la mort). Positif.

TROISIÈME OBSERVATION. — Cobaye inoculé le 17 août 1925 avec une culture de la bactériidie charbonneuse. L'animal est mort le 18 août. L'autopsie et l'ensemencement du sang du cœur montrent qu'il s'agit bien de fièvre charbonneuse.

Nous gardons les organes et les os de l'animal.

Le 24 août, nous faisons le premier examen de la moelle osseuse et nous y trouvons la bactériidie.

Le 27 août, les ensemencements faits avec la rate et le foie donnent des cultures impures dans lesquelles il est impossible de déceler la bactériidie charbonneuse. Le même jour, nous procédons, avec un organe, à la réaction d'Ascoli ; le résultat est positif.

Jusqu'au 5 septembre (18 jours après la mort de l'animal), jour où nous avons utilisé le dernier os, les examens pratiqués sur la moelle osseuse nous permettent de trouver la bactériidie.

Les os et les organes étaient conservés à la température du laboratoire ; cette température variait entre 9 et 26 degrés.

* * *

Après cette étude dans laquelle nous avons enregistré les opinions des chercheurs qui se sont occupés de la question, et rapporté nos observations personnelles, il n'est pas sans intérêt de préciser l'utilité et

les conditions d'application du procédé de diagnostic du charbon par l'emploi de la moelle osseuse.

En bactériologie, on est souvent en présence de méthodes de diagnostic qui n'ont point une valeur absolue : maintes fois, on recommande des procédés qui ont vraiment une certaine valeur, et dont la généralisation hardie conduit à des erreurs contre lesquelles il faut se prémunir.

Wulff, qui a le premier étudié cette question, montre que son procédé de diagnostic donne des résultats incontestables quand la rate et le sang ne peuvent plus être employés.

Marchisotti, Sani, Truche sont en complet accord pour admettre que la méthode doit être employée de préférence à toutes les autres.

Au Maroc, Velu la considère comme ayant une grande utilité.

En effet, le procédé d'examen de la moelle des os a, dans le diagnostic du charbon, une valeur qui n'est point absolue, mais qui est indiscutable, et il offre un grand intérêt dans la pratique courante.

On ne saurait nier son importance en ce qui concerne notamment l'examen des pièces recueillies depuis assez longtemps, car alors, il faut remarquer, c'est le seul procédé capable de fournir des renseignements sur l'étiologie d'une infection aussi importante que le charbon bactérien.

C'est là que réside son importance et c'est là que la méthode est la plus précieuse, car lorsque l'examen bactériologique des organes est impossible en raison

de la putréfaction qui fait disparaître la bactériodie, la moelle osseuse peut encore renseigner.

Nos observations montrent qu'il a été possible de déceler la bactériodie à l'état pur, dans la moelle des os, dans les conditions naturelles, jusqu'à vingt-sept jours après la mort de l'animal.

Ce délai doit varier avec les conditions du milieu.

On ne saurait trop insister sur l'intérêt pratique de cette longue conservation de la bactériodie à l'état pur en ce qui concerne notamment les pays d'élevage extensif. Le procédé est essentiellement pratique par la facilité même de son application.

Quant au choix des os à prélever, nous insistons sur l'intérêt de s'adresser toujours, de préférence, aux os longs.

CHAPITRE III

Il est des cas où le diagnostic bactériologique des produits suspects de charbon ne permet pas une conclusion. Le laboratoire dispose heureusement en l'espèce d'une méthode biologique que nous sommes amenés à étudier maintenant.

C'est la méthode de séro-diagnostic sur laquelle nos essais nous permettent quelques considérations qui nous semblent d'un certain intérêt.

Ascoli a préconisé, pour le diagnostic de la fièvre charbonneuse, un procédé biologique qui repose sur le principe suivant, établi par cet auteur: certains sérums anticharbonneux possèdent la propriété de donner un précipité spécifique, lorsqu'ils sont mis au contact d'extraits d'organes d'animaux morts de charbon.

Ce précipité, spécifique, se montre sous la forme d'un anneau blanchâtre, nuageux, au contact des deux couches liquides, l'une constituée par le sérum anticharbonneux, l'autre par l'extrait d'organe.

Selon Ascoli la préparation de l'extrait d'organes peut se faire de trois façons différentes: par ébullition, par émulsion directe à froid et par macération à froid après épuration au moyen du chloroforme; néanmoins l'auteur préconise, dans la pratique, l'extrait préparé par ébullition.

Certains bactériologistes préfèrent utiliser l'extrait chloroformé, tandis que d'autres donnent leur préférence à l'extrait obtenu par ébullition.

La réaction d'Ascoli présente le gros avantage de pouvoir être utilisée même quand les organes sont dans un état de putréfaction avancée; déjà plusieurs expérimentateurs ont constaté que la réaction est positive avec des produits, provenant d'animaux charbonneux, gardés plusieurs semaines.

Nombre d'auteurs recommandent l'emploi de la méthode d'Ascoli pour le diagnostic de la fièvre charbonneuse.

C'est ainsi que Roncaglio estime qu'elle est la plus simple et la plus sûre des méthodes; Lebre affirme qu'elle est spécifique. Néanmoins des résultats erronés sont aussi signalés.

Une série de recherches a été entreprise par Szymanski et Zagaja sur des animaux morts de charbon ou d'affections considérées comme telles: 55 fois le diagnostic établi au laboratoire a été confirmé par la précipitation; 33 fois il s'agissait du charbon, 22 fois la suspicion n'était pas légitime; 11 fois le diagnostic du charbon fut assuré par la précipitation, alors que les méthodes des bactériologiques n'ont pas permis de se prononcer; dans 3 cas, contrairement à l'analyse bactériologique, le séro-diagnostic fut négatif.

Zwick et Racebiger ont aussi obtenu des résultats défavorables.

Fischæder qui avait enregistré 56,4 0/0 d'erreurs avec un sérum délivré par Ascoli, obtient 100 0/0 d'in-

dications exactes avec le sérum que lui ont fourni Schütz et Pfeiler.

Schütz et Pfeiler, qui ont fait des recherches à ce sujet, considèrent la méthode de précipitation comme absolue pour le diagnostic du charbon chez le bœuf, où elle a révélé 22 cas de cette maladie qui auraient échappé à l'emploi des méthodes bactériologiques. Chez le cheval et chez le mouton ils trouvent que la méthode a la même valeur et qu'elle mérite aussi d'être utilisée chez le porc.

Schütz et Pfeiler croient que l'extrait simple ou chloroformé est préférable à l'extrait obtenu par ébullition ; contrairement à l'opinion de Osiander, ils trouvent qu'il n'est pas nécessaire que le sérum soit récent pour donner de bons résultats ; ils utilisent depuis deux ans, avec le même succès, un sérum anti-charbonneux additionné de phénol.

Bref, d'après Schütz et Pfeiler la méthode d'Ascoli doit être considérée comme le procédé le plus sûr pour établir l'existence de l'infection charbonneuse ; ces expérimentateurs croient que son emploi n'empêche pas de recourir aux autres méthodes et que la valeur de la réaction de précipitation apparaîtra plus nettement encore lorsque les recherches bactériologiques resteront sans résultat.

Bessemans et Leynen ont fait connaître dernièrement les résultats d'une série de recherches qu'ils ont entreprise sur la question. Leurs recherches portent sur 50 analyses d'organes, dont 20 normaux et 30 charbonneux ; plusieurs de ces organes étaient vieux de quelques semaines.

Bessemans et Leynen ont eu recours à l'extrait préparé par ébullition et au sérum précipitant délivré par l'Institut sérothérapique de Milan.

Parallèlement à chaque réaction d'Ascoli, ces expérimentateurs ont établi le diagnostic bactériologique et dans ces conditions ils n'ont jamais trouvé le procédé d'Ascoli en défaut.

Bessemans et Leynen estiment que deux conditions sont indispensables pour que la méthode donne son plein rendement; ces conditions sont une forte concentration de l'extrait et une filtration parfaite; ils insistent sur l'utilité des tubes de contrôle. Enfin, ces expérimentateurs préconisent pour le diagnostic immédiat, la précipito-réaction d'Ascoli comme la meilleure.

*
* *
*

Nous avons eu l'occasion de procéder plusieurs fois à la réaction d'Ascoli et nous avons toujours suivi dans ce cas la technique décrite par Calmette, Boquet et Nègre, qui nous a été conseillée par M. Rinjard. C'est la suivante :

« On additionne les produits suspects (rate, foie, etc...) finement broyés (nous faisons ce broyage à l'aide du sable stérile) de quatre à cinq fois leur poids d'eau physiologique et on fait bouillir cinq minutes; on filtre à froid sur papier jusqu'à ce que le liquide devienne clair.

Dans un petit tube à essai, de 3 à 4 millimètres de diamètre on verse 0 cmc 5 de sérum précipitant anti-

charbonneux, puis avec une pipette à effilure très fine on ajoute dans le même tube 0 cmc. 5 du filtrat précédent, en prenant la précaution d'appliquer l'extrémité de la pipette contre la paroi du tube pour que les liquides restent superposés.

Si les organes proviennent d'un animal mort de charbon, un trouble annulaire caractéristique se forme à la surface de contact des deux liquides. »

En ce qui concerne le sérum, nous avons toujours utilisé le sérum anticharbonneux délivré par l'Institut Pasteur de Paris.

Nous avons procédé à 13 réactions avec des produits prélevés sur des animaux charbonneux et nous avons toujours obtenu une réaction positive.

Parmi les organes que nous avons utilisés, il s'en trouvait de vieux de plus de quatre semaines et dans un état de putréfaction avancée.

Nos réactions ont été toujours contrôlées et nous n'avons jamais trouvé le procédé d'Ascoli en défaut.

Dans un cas où nous avons utilisé un extrait préparé avec un organe de cheval mort d'anémie infectieuse, la réaction a été négative ; dans un autre cas où nous avons opéré, fait essentiel, avec une culture d'un bacille pseudo-charbonneux, nous obtenons aussi un résultat négatif.

*
x x

Nous allons passer à la description d'un cas particulier dans lequel l'utilité de la réaction d'Ascoli nous a été nettement démontrée.

Appelé à préciser l'étiologie d'un accident infectieux apparu dans un troupeau de moutons, nous sommes amenés à faire l'examen bactériologique d'un prélèvement effectué sur un sujet présentant à l'autopsie des signes suspects de charbon.

Le fragment de rate dont nous disposons est ramolli mais le tissu n'est que peu diffluent.

L'examen direct met en évidence de nombreux germes de types morphologiques très divers, conséquence de l'altération d'un produit déjà anciennement récolté.

Nous pratiquons successivement une culture de pulpe splénique sur gélose et une réaction d'Ascoli.

Tandis que cette dernière donne un résultat nettement positif, les cultures examinées le lendemain ne présentent pas, à l'œil nu, les caractères classiques d'une culture de charbon.

La majorité des colonies obtenues sont grasses et luisantes, et il faut regarder au microscope pour apercevoir les houppes ondulées de leurs bords.

L'examen microscopique montre des bacilles restant colorés par la méthode de Gram sans caractères absolument précis, accompagnés de nombreuses espèces banales.

Avertis par le résultat positif donné par la réaction d'Ascoli, nous voulons nous assurer de l'identité des microbes suspects et nous inoculons un quart de centimètre cube d'émulsion de la culture impure à un cobaye. Celui-ci est encore vivant après quarante-huit heures.

Mais sachant que l'antagonisme peut s'exercer à l'égard du bacille du charbon virulent du fait de l'existence de microbes associés, nous chauffons quinze minutes, à 80 degrés, une émulsion de la culture faite en partant de la pulpe splénique.

Nous obtenons alors des colonies pures d'un bacille dont les caractères cultureux et la morphologie atypiques font penser à un pseudo-charbonneux.

Le doute ne devait pas subsister et deux cobayes inoculés avec un quart de centimètre cube d'une émulsion de culture pure (même dose que pour la culture impure) succombent avec les lésions classiques du charbon : œdème gélatineux, blanchâtre, rate hypertrophiée. Leur sang donne une culture pure de bactérie charbonneuse.

Il s'agit donc bien d'une bactériodie charbonneuse virulente pour le cobaye et le mouton.

Nous venons de voir que la réaction précipitante d'Ascoli, parfaitement nette que nous avons obtenue immédiatement après l'arrivée de la pièce au laboratoire, a été pour nous extrêmement précieuse. Ce résultat positif nous a guidés malgré les résultats paradoxaux qui auraient pu nous faire conclure à l'existence d'un bacille pseudo-charbonneux. C'est en nous basant sur cette réaction que nous avons pu immédiatement faire prendre les mesures nécessaires pour arrêter l'évolution du charbon bactérien dans le troupeau.

A notre sens la réaction d'Ascoli vaut mieux que les critiques qui lui ont été faites. Sans doute ses défaillances sont-elles liées à l'usage d'un sérum anti-charbonneux trop pauvre en précipitines. En un tel cas, il convient d'utiliser le procédé préconisé par Vallée pour la concentration des anticorps des sérums préparés. Le sérum est jeté goutte à goutte dans dix fois son volume d'eau stérile distillée, saturée d'acide carbonique. Les globulines précipitent et avec elles les précipitines. Le précipité est redissout en eau physiologique stérile, dans un volume dix ou cinquante ou cent fois inférieur à celui du sérum précipité fournissant ainsi un anticorps de dix à cent fois plus actif que le sérum utilisé.

CONCLUSIONS.

1. Les recherches de laboratoire sont indispensables pour assurer d'une façon certaine le diagnostic de la fièvre charbonneuse sur le cadavre.

2. Dans la grande majorité des cas l'examen bactérioscopique des produits suspects de charbon est insuffisant pour révéler l'existence de la maladie et affirmer sa véritable nature.

3. La culture, suivie de l'inoculation, permet dans certains cas de poser un diagnostic sûr, et assez rapide quand on dispose de produits frais où la bactériémie existe encore à l'état de pureté.

4. Dans la pratique courante les produits envoyés au laboratoire, pour le diagnostic de la fièvre charbonneuse, arrivent trop souvent dans un état de putréfaction avancée, ce qui rend le diagnostic difficile, voire même impossible.

5. En raison de la putréfaction qui envahit rapidement les cadavres charbonneux et détruit dans les organes l'agent spécifique de l'infection, l'examen bactérioscopique des produits prélevés quelque temps après la mort ne peut en rien renseigner sur la nature de la maladie.

6. Dans les cadavres c'est dans la moelle osseuse que la bactériémie charbonneuse trouve les meilleures con-

ditions de conservation. Cette résistance offre un grand intérêt pratique en ce qui concerne l'envoi au laboratoire des produits suspects de charbon en vue du diagnostic.

7. Dans nos expériences la bactéridie charbonneuse s'est conservée à l'état de pureté dans la moelle osseuse jusqu'au vingt-septième jour après la mort.

8. Le diagnostic par l'examen de la moelle osseuse est le procédé de choix pour le diagnostic bactériologique à distance du charbon bactéridien. Il faut s'adresser de préférence à un os long; (les métatarsiens et métacarpiens sont recommandés).

9. Dans le cas où ces moyens ne permettront pas de poser un diagnostic ou quand ils ne pourront pas être utilisés on devra recourir à la précipito-réaction d'Ascoli; cette réaction sera pratiquée avec un sérum dont les essais de contrôle auront démontré le pouvoir précipitant et la spécificité.

Vu : le Président de la thèse,
BRUMPT

Vu : Le Doyen,
ROGER

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
P. LAPIE

BIBLIOGRAPHIE

1. *Nocard et Leclainche.* — Les maladies microbiennes des animaux, 3^e édition, 1903.
2. *Vallée (H.).* — La bactériémie charbonneuse. Cours de microbiologie de l'Institut Pasteur de Paris, 1925.
3. *Moussu (G.) et Moussu (R.).* — Traité des maladies du gros bétail, 4^e édition, 1922, t. II.
4. *Courmont (J.) et Panisset (L.).* — Précis de microbiologie des maladies infectieuses des animaux domestiques. O. Doin, éditeur. Paris, 1914.
5. *Dopter et Sacquépée.* — Précis de bactériologie, 2^e édition, 1921, t. I.
6. *Kolle (W.) et Hetsch (H.).* — La Bactériologie expérimentale, 3^e édition française, 1918, t. I.
7. *Calmette (A.), Nègre (L.) et Bocquet (A.).* — Manuel de technique de microbiologie et sérothérapie. Paris, 1925.
8. *Velu (H.) et Barotte (J.).* — Eléments pratiques de Pathologie vétérinaire exotique. Paris, 1924.
9. *Piettre (M.).* — Inspection des viandes et aliments d'origine carnée. Paris, 1922, t. II.
10. *Panisset (L.).* — La fièvre charbonneuse. Considérations relatives à la maladie dans nos possessions d'outre-mer. Extrait de l'Agronomie coloniale, déc. 1922. Paris.
11. *Velu (H.).* — Rapport sur le fonctionnement du Laboratoire de Recherches du Service d'Elevage au Maroc (Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie, t. III, 1925).
12. *Bessemans (A.) et Leynen (E.).* — Recherches sur le diagnostic de laboratoire du charbon bactériemien (Annales de Médecine vétérinaire. Bruxelles, août et septembre 1922).

13. Müller (M.) et Engler (A.). — Über die Erhöhung der Leistungsfähigkeit des strasburger Verfahrens zum Nachweis von Milzbrand (Zeitsch. f. infektiöskran. der Haustiere), t. VIII, octobre 1910).
- Analyse (Bulletin de l'Institut Pasteur de Paris, 1911).
14. Bozzelli (R.). — Sulla conservazione dei materiali charbonchiosi tra le fiebre dei fusti ferula (*Ferula communis*) (Annali d. Staz. sp. per le mal. inf. d. Bestiane. Naples, 1911-1913, t. I).
- Analyse (Bulletin de l'Institut Pasteur de Paris, t. XII, 1914).
15. Ciuca (Al.) et Stoicescu (G.). — Diagnostic bactériologique du charbon par les cultures de la peau (Archiva veterinaria, mars-avril, 1909, p. 71-85).
16. Ciuca (A.) et Stoicescu (G.). — Le diagnostic bactériologique du charbon par les cultures de la peau (Réunion biol. Bucarest) (C. R. Société Biologie, t. LXVII, 1909, p. 140).
17. Ciuca (A.) et Fenea (G.). — Recherches sur le diagnostic « post mortem » du charbon bactériodien par l'examen bactériologique des matières fécales (Réunion biol. Bucarest) (C. R. Soc. Biol., t. LXVII, 1909, p. 301).
18. Frey (J.-J.). — Problems in anthrax control (Journal Am. vet. med. Ass'n, mai 1919).
19. Wulff (F.). — Die Milzbrand-Diagnose durch Untersuchung des Knochenmarks (Berliner tierärztliche Wochenschrift, 13 juin 1912).
20. Marchisotti (A.-C.). — Diagnostico de la fiebre carbunclosa. Recoleccion de materiales (Revista de la Facultad de agronomia y veterinaria de la Plata, t. XII, n° 1, 1915).
21. Marchisotti (A.-C.). — Contribucion al diagnostico de la fiebre carbunclosa (Revista de la Facultad de agronomia y veterinaria de la Plata, t. XII, 1917).
22. Truche. — A propos de la typhose aviaire (Bulletin de la Société centrale de Médecine vétérinaire, 1921, p. 398).
23. Altara (I.). — Sur valore del metodo di Wulff nella diagnosi batteriologica del colera aviaire (La Nuova Veterinaria, N. 2, 15 février 1923).

25. *Giovine (D.)*. — Il metodo di Wulff nella diagnosi del mal rosino (La Nuova Veterinaria. N. 8, 15 août 1925).
25. *Ascoli (A.)*. — La precipitina nella diagnosi del carbonchio ematico (La Clinica Veterinaria. N. 1, 15 janvier 1911).
26. *Schütz et Pfeiler*. — Nouvelles recherches sur le diagnostic du charbon au moyen de la méthode de précipitation (Arch. für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde, t. 40, liv. 5 et 6 mai 1914).
- Analyse (Revue générale de Médecine vétérinaire, 1918).
27. *Vallée (H.)*. — Sur la concentration des anticorps coagulants (C. R. de la Société de Biologie, 1913, t. LXXIV, p. 1065).

